



Title	Isolation of flat revertants from human papillomavirus type 18 E6 E7 transformed 3Y1 cells by transfection with a rat embryo fibroblast cDNA expression library
Author(s)	中西, 一吉
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38924
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なかにし かず よし 中 西 一 吉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Isolation of flat revertants from human papillomavirus type18 E 6 E 7 transformed 3 Y 1 cells by transfection with a rat embryo fibroblast cDNA expression library (ラット初代培養線維芽細胞 cDNA 発現ライブラリーの形質導入による ヒトパピローマウイルス18型 E6E7 でトランスフォームした 3 Y 1 から のフラットリバータントの単離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 羽 倉 明 (副査) 教 授 山 西 弘 一 教 授 上 田 重 晴

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ヒトパピローマウイルス (HPV) の癌遺伝子である E6E7 遺伝子は、継代培養細胞 (rat established cell line F2408) を癌化できるが、初代培養細胞 (rat embryo fibroblast REF) に対して、不死化き起こすが癌化はさせない。

われわれは HPV16E6E7 で癌化した F2408 細胞と REF を細胞融合させることにより、REF には E6E7 の癌化を抑制できる遺伝子の存在する可能性を以前に示した。今回、これらの遺伝子を単離する目的で、REF の cDNA expression library を作製し、これを E6E7 により癌化した細胞 18T 3 Y 1 に形質導入した。

【方法ならびに成績】

18T 3 Y 1 に REF cDNA library を形質導入し、G418 選択ののちプールした。プールした細胞を、癌形質をもつ細胞を選択的に死滅させる薬剤である cis-hydroxy-proline $150 \mu\text{g/ml}$ によって処理し生存したコロニーより 33 の flat なクローンをえた。そのうち 18 クローンでは E6E7 mRNA は親株と変化なかった。18 クローンのうち形態および軟寒天培地での増殖性において安定な非癌化形質をもつものは 12 クローンであった。neo gene をプローブとして Southern blot を行った結果、12 クローンのうち 2 組は sibling であると考えられたため、最終的に独立した 10 クローンの revertant をえた。これら 10 種の revertant 細胞と 18T 3 Y 1 の細胞融合を行った結果、非癌化形質が優性であった。marker rescue 法により、これらの細胞から cDNA plasmid を回収した。pcD2 vector の one cut enzyme である Sal I よりも、no cut enzyme で互いに連結可能な NheI, SpeI, XbaI の 3 種の酵素の組み合わせて消化後に ligation を行った方が効率よく回収できた。

revertant の 1 つである R31 より回収した cDNA plasmid, p31XN7 は、R31x18T 3 Y 1 hybrid cell および長期培養後の R31 の軟寒天培地中でコロニー形成能を再び獲得したクローンにおいて、選択的に欠失していた。31XN7 cDNA をプローブとして library をスクリーニングし、1.5kb の cDNA をもつ N31 を回収した。REF では 1.0kb, 1.7kb の 2 つの size の mRNA が認められるので、1.5kb の cDNA は全長に近いものと考えられた。sequence の結果、N31 と p31XN7 cDNA の DNA 配列は重複部分では一致していた。N31 は各 frame に終止コドンを含み、短い open reading frame しか持たなかった。各種のゲノム DNA に対する Southern blot の結果、N31 遺伝子は種間で保存されていると考えられた。N31 は 3' 側に mRNA degradation motif である ATTTA を含んでいた。この motif を含む SphI 以下の 3' 側を欠損させ SR α promoter により N31 を過剰発現させたところ 18T 3 Y 1 の軟寒天培地でのコロニー

形成能は減少した。

【総括】

株化細胞と異なり初代培養細胞は HPV の癌遺伝子である E6 E7 だけでは癌化しない。また初代培養細胞と E6 E7 で癌化した株化細胞の融合細胞においては、非癌化形質が優性である。よって初代培養細胞には癌化を抑制する機構が存在すると考えられる。この機構に関与する遺伝子を単離する目的で、HPV18 E6 E7 により癌化した 3 Y 1 細胞に REF cDNA library を形質導入し、10種の revertant 細胞をえた。

そのうちの 1 つである R31 から回収した p31XN 7 は、再び癌化形質を示すようになった細胞中では選択的に欠失しており、この cDNA の発現が癌化を抑制している可能性が示唆された。plasmid 回収の際の cDNA 中の rearrange の可能性があるので、p31XN 7 cDNA をプローブとして、REF cDNA library をスクリーニングして 1.5kb の cDNA をもつ N31 を新たに回収した。N31 の過剰発現により 18T 3 Y 1 の軟寒天培地中でのコロニー形成能は減少した。sequence の結果、N31 は各 frame に終止コドンを含み、予想される open reading frame は短いものであることがわかった。最近、タンパクをコードせずに RNA として機能すると考えられている H19 が癌抑制能力をもつことが報告された。N31 についてもタンパクとして機能するのか RNA として機能するのか検討中である。N31 は各種のゲノム DNA に対する southern blot により種間で保存されていることが示唆され、生物学的に意義のある遺伝子と考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラットをはじめヒト初代培養細胞中には、ヒトパピローマウイルスの癌遺伝子である E6E7 のトランスフォーム活性を抑制する遺伝子の存在が示唆されている。本研究は、これらの遺伝子を単離する目的で行われた。ラット初代培養細胞の cDNA 発現ライブラリーを、E6E7 によりトランスフォームした細胞に形質導入し、10種の独立したリバートアント細胞をえた。これらのリバートアントの 1 つから、回収した cDNA は、その過剰発現により E6E7 で癌化した細胞のトランスフォーム活性を抑制することを示した。また、この cDNA の塩基配列を決定し、その homolog がヒトにも存在する可能性を示した。一般にヒトパピローマウイルスの感染から子宮頸癌発生までには、長い潜伏期間が必要であり、同ウイルスによる発癌には宿主細胞の遺伝子変化が必要と考えられる。本研究は、これらの遺伝子変化を明らかにするとともに、子宮頸癌発生機構の解明に重要な知見を提供するものと考えられる。

以上のことから本論文は学位に値するものと思われる。